



## Minuman susu fermentasi berperisa



© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Klasifikasi.....	1
4 Komposisi .....	1
5 Syarat mutu .....	2
6 Pengambilan contoh.....	3
7 Cara uji .....	3
8 Syarat lulus uji .....	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan .....	4
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh minuman susu fermentasi berperisa.....	5
Lampiran B (normatif) Cara uji minuman susu fermentasi berperisa .....	9
Bibliografi.....	44
Gambar B.1 - Uji CAMP untuk <i>Listeria monocytogenes</i> : pola inokulasi <i>sheep blood agar plate</i> .....	38
Gambar B.2 - Metoda pengenceran .....	41
Tabel 1 - Syarat mutu minuman susu fermentasi berperisa .....	2
Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg.....	7
Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg .....	7
Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg .....	7
Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg.....	8
Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg .....	8
Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg .....	8
Tabel B.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh .....	25
Tabel B.2 - Reaksi biokimia dan serologi <i>Salmonella sp</i> .....	32
Tabel B.3 - Reaksi biokima dan serologi untuk non <i>Salmonella sp</i> .....	32
Tabel B.4 - Kit uji pendeteksi <i>Listeria</i> yang diizinkan.....	35
Tabel B.5 - Perbedaan beberapa spesies <i>Listeria</i> .....	37



Tabel B.6 - Kit uji yang berguna dalam penegasan isolat <i>Listeria</i> sebagai <i>Listeria monocytogenes</i> atau bukan* .....	37
Tabel B.7 - Uji penguatan hemolisis CAMP dari spesies-spesies <i>Listeria</i> .....	38
Tabel B.8 - Serologi untuk spesies <i>Listeria</i> .....	39





## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Minuman susu fermentasi berperisa* ini merupakan SNI baru.

Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri kopi gula susu dalam kemasan.

Didalam merumuskan SNI ini tim telah Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-undang Republik Indonesia No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan.
3. Undang-undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
8. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman Departemen Perindustrian. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 9 Desember 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Juni 2009 sampai dengan tanggal 22 Agustus 2009 dengan hasil RASNI.







## Minuman susu fermentasi berperisa

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji minuman susu fermentasi berperisa.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **minuman susu fermentasi berperisa**

minuman berbahan dasar susu fermentasi yang diberi perisa, dapat ditambahkan bahan pangan lain dengan atau tanpa perlakuan panas, serta dikemas secara kedap

#### 2.2

##### **susu fermentasi**

produk susu yang dihasilkan dari fermentasi susu atau susu rekonstitusi atau susu rekombinasi yang diperoleh dari fermentasi dengan bakteri asam laktat dan dengan atau tanpa mikroba lain yang sesuai

### 3 Klasifikasi

#### 3.1 Minuman susu fermentasi berperisa tanpa perlakuan panas

- a) Minuman susu fermentasi berperisa.
- b) Minuman susu fermentasi berperisa tanpa lemak.

#### 3.2 Minuman susu fermentasi berperisa dengan perlakuan panas

- a) Minuman susu fermentasi berperisa.
- b) Minuman susu fermentasi berperisa tanpa lemak.

### 4 Komposisi

#### 4.1 Bahan baku utama

Susu, susu rekonstitusi, susu rekombinasi, bakteri asam laktat

#### 4.2 Bahan pangan lain yang dapat ditambahkan

Bahan pangan yang diizinkan;

#### 4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk produk minuman susu fermentasi berperisa sesuai dengan ketentuan yang berlaku.



## 5 Syarat mutu

Syarat mutu minuman susu fermentasi berperisa sesuai Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1 - Syarat mutu minuman susu fermentasi berperisa**

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan			
			Tanpa perlakuan panas setelah fermentasi		Dengan perlakuan panas setelah fermentasi	
			Normal	Tanpa lemak	Normal	Tanpa lemak
1	Keadaan:					
1.1	Penampakan	-	cair		cair	
1.2	Bau	-	normal/khas		normal/khas	
1.3	Rasa	-	asam/khas		asam/khas	
1.4	Homogenitas	-	homogen		homogen	
2	Lemak (b/b)	%	min 0,6	maks 0,5	min 0,6	maks 0,5
3	Padatan susu tanpa lemak (b/b)	%	min. 3,0		min. 3,0	
4	Protein (Nx6,38) (b/b)	%	Min. 1,0		Min. 1,0	
5	Abu (b/b)	%	maks. 1,0		maks. 1,0	
6	Keasaman tertitrasi (dihitung sebagai asam laktat) (b/b)	%	0,2 s.d 0,9		0,2 s.d 0,9	
7	Cemaran logam:					
7.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,02		maks. 0,02	
7.2	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03		maks. 0,03	
8	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,1		maks. 0,1	
9	Cemaran mikroba:					
9.1	Bakteri <i>coliform</i>	APM/ml	maks. 10		maks. 10	
9.2	<i>Salmonella sp</i> / 25 ml	-	negatif		negatif	
9.3	<i>Listeria monocytogenes</i> / 25 ml	-	negatif		negatif	
10	Kultur starter	Koloni/ml	min. $1 \times 10^6$		-	



## 6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai Lampiran A.

## 7 Cara uji

Cara uji untuk semua parameter syarat mutu minuman susu fermentasi berperisa seperti dibawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran B.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran B.2.
  - Cara uji penampakan sesuai Lampiran B.2.1
  - Cara uji bau sesuai Lampiran B.2.2
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran B.2.3
  - Cara uji homogenitas sesuai Lampiran B.2.4
- c) Cara uji lemak sesuai Lampiran B.3.
- d) Cara uji padatan susu tanpa lemak sesuai Lampiran B.4.
- e) Cara uji protein sesuai Lampiran B.5.
- f) Cara uji abu sesuai Lampiran B.6.
- g) Cara uji keasaman tertitrasi (dihitung sebagai asam laktat) sesuai Lampiran B.7.
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran B.8.
  - Cara uji timbal (Pb) sesuai Lampiran B.8.1.
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran B.8.2.
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran B.9
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran B.10.
  - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran B.10.1.
  - Cara uji bakteri *coliform* sesuai Lampiran B.10.2
  - Cara uji *Salmonella sp* sesuai Lampiran B.10.3.
  - Cara uji *Listeria monocytogenes* sesuai Lampiran B.10.4.
- k) Cara uji kultur starter sesuai Lampiran B.11

## 8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

## 9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada ketentuan yang berlaku, tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## 10 Pengemasan

Minuman susu fermentasi berperisa dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.



## 11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan. Produk minuman susu fermentasi berperisa dengan perlakuan panas setelah fermentasi pada label harus dicantumkan tulisan "*telah diperlakukan panas (heat treated)*".





## Lampiran A (normatif)

### Cara pengambilan contoh minuman susu fermentasi berperisa

#### A.1 Prinsip

Pengambilan contoh minuman susu fermentasi berperisa yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL (*Acceptance Quality Level*) 6,5 dan contoh diambil secara acak.

#### A.2 Penerapan pengambilan contoh

##### A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) ukuran lot (N);
- c) ukuran kemasan terkecil (bobot bersih dalam kg); dan
- d) ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalnya penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

##### A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:  
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).  
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih meyakinkan;
- b) tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil minuman susu fermentasi berperisa;
- c) tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1;
- d) ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot;
- e) uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar;
- f) gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A; dan
- g) nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c);



### A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

#### A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 400 karton yang berisi kemasan berukuran 50 x 65 ml setiap kartonnya. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- |    |   |   |  |
|----|---|---|--|
| a) | ukuran lot (N)                          | : | 400 x 50 atau 20 000 unit                              |
| b) | ukuran kemasan                          | : | 65 ml  |
| c) | tingkat inspeksi                        | : | I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.1) |
| d) | ukuran contoh (n)                       | : | 13   |
| e) | jumlah maksimum cacat yang diterima (c) | : | 2  |

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

#### A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- |    |   |   |   |
|----|---|---|---|
| a) | ukuran lot (N)                          | : | 400 x 50 atau 20 000 unit                               |
| b) | ukuran kemasan                          | : | 65 ml   |
| c) | tingkat inspeksi                        | : | II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.1) |
| d) | ukuran contoh (n)                       | : | 21  |
| e) | jumlah maksimum cacat yang diterima (c) | : | 3   |

#### A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, jumlah maksimum cacat yang diterima sebanyak 6 atau 9.



**A.3 Rancangan pengambilan contoh****A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)****Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4 800 atau kurang	6	1
4 801 s.d 24 000	13	2
24 001 s.d 48 000	21	3
48 001 s.d 84 000	29	4
84 001 s.d 144 000	48	6
144 001 s.d 240 000	84	9
Lebih dari 240 000	126	13
<b>CATATAN:</b> s.d adalah sampai dengan		

**Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2 400 atau kurang	6	1
2 401 s.d 15 000	13	2
15 001 s.d 24 000	21	3
24 001 s.d 42 000	29	4
42 001 s.d 72 000	48	6
72 001 s.d 120 000	84	9
Lebih dari 120 000	126	13
<b>CATATAN:</b> s.d adalah sampai dengan		

**Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 s.d 2 000	13	2
2 001 s.d 7 200	21	3
7 201 s.d 15 000	29	4
15 001 s.d 24 000	48	6
24 001 s.d 42 000	84	9
Lebih dari 42 000	126	13
<b>CATATAN:</b> s.d adalah sampai dengan		



## A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)

Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4 800 atau kurang	13	2
4 801 s.d 24 000	21	3
24 001 s.d 48 000	29	4
48 001 s.d 84 000	48	6
84 001 s.d 144 000	84	9
144 001 s.d 240 000	126	13
Lebih dari 240 000	200	19
<b>CATATAN:</b> s.d adalah sampai dengan		

Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2 400 atau kurang	13	2
2 401 s.d 15 000	21	3
15 001 s.d 24 000	29	4
24 001 s.d 42 000	48	6
42 001 s.d 72 000	84	9
72 001 s.d 120 000	126	13
Lebih dari 120 000	200	19
<b>CATATAN:</b> s.d adalah sampai dengan		

Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 s.d 2 000	21	3
2 001 s.d 7 200	29	4
7 201 s.d 15 000	48	6
15 001 s.d 24 000	84	9
24 001 s.d 42 000	126	13
Lebih dari 42 000	200	19
<b>CATATAN:</b> s.d adalah sampai dengan		



**Lampiran B**  
(normatif)  
**Cara uji minuman susu fermentasi berperisa**

**B.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

**B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan minuman susu fermentasi berperisa dan ambil contoh minuman susu fermentasi berperisa sesuai yang diperlukan minimum 350 ml secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia**

Buka kemasan minuman susu fermentasi berperisa dan ambil contoh minuman susu fermentasi berperisa sesuai yang diperlukan minimum 350 ml secara hati-hati dengan menuangkan contoh kedalam botol contoh yang bersih dan kering. Jika ukuran kemasan kurang dari 350 ml maka ambil beberapa kemasan sehingga minuman susu fermentasi berperisa menjadi 350 ml

**B.2 Keadaan****B.2.1 Penampakan****B.2.1.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan.

**B.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 ml dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh uji untuk mengetahui apakah ada debu, kotoran dan bahan berbahaya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

**B.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) jika tidak terdapat debu, kotoran dan bahan berbahaya maka hasil dinyatakan "normal";
- b) jika terdapat debu, kotoran dan bahan berbahaya maka hasil dinyatakan "tidak normal".



## **B.2.2 Bau**

### **B.2.2.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman.

### **B.2.2.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 ml dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### **B.2.2.3 Cara menyatakan hasil**

- a) jika tercium bau khas minuman susu fermentasi berperisa maka hasil dinyatakan "normal";
- b) jika tercium bau asing selain bau khas minuman susu fermentasi berperisa maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## **B.2.3 Rasa**

### **B.2.3.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera pengecap.

### **B.2.3.2 Cara kerja**

- a) Ambil kira-kira 1 sendok contoh uji dan rasakan dengan lidah; dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### **B.2.3.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika terasa khas minuman susu fermentasi berperisa maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika terasa rasa asing selain rasa khas minuman susu fermentasi berperisa maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## **B.2.4 Homogenitas**

### **B.2.4.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan.

### **B.2.4.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 ml dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh apakah contoh uji tersebut komponen padat dan cairan terpisah atau tidak; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### **B.2.4.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika komponen padat tidak terpisah dengan cairannya, maka hasil dinyatakan homogen
- b) Jika komponen padat terpisah dengan cairannya, maka hasil dinyatakan tidak homogen



### B.3 Lemak

#### B.3.1 Prinsip

Lemak dalam contoh dihidrolisis dengan amonia dan alkohol kemudian diekstraksi dengan eter. Ekstrak eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dalam pinggan alumunium dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

#### B.3.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- pipet volumetrik 25 ml;
- penangas air;
- labu ekstraksi/ labu lemak *Mojonnier*;
- sentrifuse;
- oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- desikator yang berisi desikan;
- pinggan aluminium;
- gelas ukur;
- tang/penjepit; dan
- tutup labu.

#### B.3.3 Pereaksi

- Air suling;
- amonium hidroksida pekat;
- indikator fenolftalein 0,5 %;
- etil alkohol 95 %;
- etil eter, bebas peroksida; dan
- petroleum eter.

#### B.3.4 Cara kerja

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) minuman susu fermentasi berperisa ke dalam labu ekstraksi, tambahkan 10 ml air suling, aduk sehingga membentuk pasta, dan panaskan jika diperlukan;
- tambahkan 1 ml sampai dengan 1,25 ml ammonium hidroksida pekat, panaskan dalam penangas air pada suhu 60 °C sampai dengan 70 °C selama 15 menit, diaduk beberapa kali dan dinginkan;
- tambahkan 3 tetes indikator fenolftalein, 10 ml alkohol 95 %, tutup labu ekstraksi, dan aduk selama 15 detik;
- untuk ekstraksi pertama; tambahkan 25 ml etil eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- tambahkan 25 ml petroleum eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- sentrifuse labu tersebut pada 600 rpm selama 30 detik sehingga terjadi pemisahan fasa air (*bright pink*) dan eter dengan jelas;
- tuangkan lapisan eter dengan hati-hati ke dalam labu lemak atau pinggan aluminium kosong yang telah diketahui bobotnya ( $W_0$ );
- lapisan air digunakan untuk ekstraksi berikutnya;
- untuk ekstraksi kedua, ulangi cara kerja c sampai dengan j dengan penambahan 5 ml alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter;



- l) untuk ekstraksi ketiga, ulangi cara kerja c sampai dengan j dengan tanpa penambahan alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter; (ekstraksi ke-3 tidak perlu dilakukan untuk susu skim)
- m) uapkan pelarut di atas penangas air dan keringkan labu lemak/pinggan aluminium yang berisi ekstrak lemak tersebut dalam oven pada suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 30 menit atau oven vakum pada suhu  $70 ^\circ\text{C}$  sampai dengan  $75 ^\circ\text{C}$  dengan tekanan  $< 50 \text{ mm Hg}$  (6,7 Kpa); dan
- n) dinginkan dalam desikator dan timbang hingga bobot tetap ( $W_1$ ).

### B.3.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)}{W} \times 100 \%$$

#### keterangan;

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram(g);

$W_0$  adalah bobot labu lemak/pinggan aluminium kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot labu lemak/pinggan aluminium kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

### B.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 10 % maka analisis harus diulang kembali.

## B.4 Padatan susu tanpa lemak

### B.4.1 Prinsip

Total padatan susu tanpa lemak adalah total padatan dikurangi total lemak.

### B.4.2 Penetapan total padatan susu

#### B.4.2.1 Prinsip

Total padatan susu dihitung sebagai bobot contoh yang tersisa setelah pemanasan dalam oven pada suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 4 jam.

#### B.4.2.2 Peralatan

- a) Pinggan untuk menimbang berdiameter 5 cm;
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) penangas air;
- d) desikator berisi silika;
- e) tang/penjepit; dan
- f) oven terkalibrasi.

#### B.4.2.3 Cara kerja

- a) Timbang pinggan kosong yang sebelumnya telah dipanaskan di dalam oven  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $\geq 2$  jam ( $W$ ). Timbang juga 1 pinggan kosong sebagai blanko ( $B_1$ ), kemudian pinggan kosong dipanaskan pada oven suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $\geq 2$  jam sebagai blanko ( $B_2$ );



- b) timbang 3 g contoh (yang sudah dipanaskan pada  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  ke dalam pinggan tadi ( $W_1$ );
- c) masukkan pinggan berisi contoh ke dalam oven dan keringkan selama 4 jam pada suhu  $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$  (selama pengeringan pintu oven jangan dibuka); dan
- d) pindahkan pinggan dalam desikator dan biarkan dingin pada suhu kamar (30 menit) kemudian timbang ( $W_2$ ).

#### B.4.2.4 Perhitungan

$$\text{Total padatan susu (\%)} = \frac{(W_1 - W_2) - (B_1 - B_2)}{W_1 - W} \times 100 \%$$

##### keterangan :

- W adalah bobot pinggan, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_1$  adalah bobot pinggan + contoh susu, dinyatakan dalam gram (g);
- $W_2$  adalah bobot pinggan + susu kering, dinyatakan dalam gram (g);
- B adalah bobot blanko sebelum dipanaskan, dinyatakan dalam gram (g);
- $B_1$  adalah bobot blanko sesudah dipanaskan, dinyatakan dalam gram (g).

#### B.4.3 Penetapan total padatan susu tanpa lemak

##### Perhitungan :

Total padatan susu tanpa lemak (%) = total padatan (%) – total lemak (%) (B.3).

#### B.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan disarankan maksimal 0,05 % dari nilai rata-rata hasil total padatan

### B.5 Protein ( $N \times 6,38$ )

#### B.5.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  menggunakan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sebagai katalis dan  $\text{K}_2\text{SO}_4$  untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi  $\text{NH}_3$  pada saat destilasi menggunakan  $\text{NaOH}$ .  $\text{NH}_3$  yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan amonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,38 ( $N \times 6,38$ ).

#### B.5.2 Peralatan

- a) Labu Kjeldahl 100 ml;
- b) distilator dan kelengkapannya;
- c) pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- d) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) buret 10 ml terkalibrasi; dan
- f) batu didih.



**B.5.3 Pereaksi**

- Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat bebas nitrogen;
- larutan katalis tembaga,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  bebas nitrogen 0,05 g/ml  $\text{H}_2\text{O}$ ;  
larutkan 5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas;
- katalis selen;  
campurkan 4 g serbuk  $\text{SeO}_2$ , 150 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- kalium sulfat,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  bebas nitrogen;
- batu didih;
- larutan indikator *methyl red* (MR) / *bromocresol green* (BCG);  
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan asam borat,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;  
larutkan 40 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan natrium hidroksida,  $\text{NaOH}$  30 %;  
larutkan 600 g hablur  $\text{NaOH}$  dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %; dan  
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.
- larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  0,1000M.  
pipet dengan hati-hati 8,60 ml  $\text{HCl}$  pekat (36,5 % sampai dengan 38 %) kedalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.

**B.5.4 Cara kerja**

- Timbang 1 g contoh ke dalam labu Kjeldahl, tambahkan 15,00 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1 ml larutan katalis  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 ml larutan  $\text{NaOH}$  30 %. (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan  $\text{HCl}$  0,1000 M; dan
- kerjakan penetapan blanko.

**B.5.5 Perhitungan**

$$\text{Protein} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,38 \times 100 \%}{W}$$

- $V_1$  adalah Volume  $\text{HCl}$  0,1000 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 $V_2$  adalah Volume  $\text{HCl}$  0,1000 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 $N$  adalah Normalitas larutan  $\text{HCl}$ ;



W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);  
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;  
 6,38 adalah faktor protein untuk susu.

### B.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 10 % maka analisis harus diulang kembali.

## B.6 Abu

### B.6.1 Prinsip

Bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih. Kadar abu dihitung secara gravimetri.

### B.6.2 Peralatan

- Desikator yang berisi silika;
- cawan porselin/kwarsa yang berukuran 50 sampai dengan 100 ml;
- oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas air; dan
- pemanas listrik.

### B.6.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu  $(525 \pm 5)$  °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik ( $W_0$ );
- masukkan 5 sampai dengan 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang ( $W_1$ );
- panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu  $(100 \pm 2)$  °C sampai  $H_2O$  hilang;
- tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tungku pembakaran pada suhu  $(525 \pm 5)$  °C sampai terbentuk abu berwarna putih;
- tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik kemudian diabukan kembali pada suhu  $(525 \pm 5)$  °C sampai mencapai bobot yang tetap;
- pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang ( $W_2$ );
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar abu dalam contoh.

### B.6.4 Perhitungan

$$\text{Abu (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

#### keterangan:

$W_0$  adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot cawan dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot cawan dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).



### B.6.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 10 % maka analisis harus diulang kembali.

### B.7 Keasaman tertitrasi

#### B.7.1 Prinsip

Jumlah asam dihitung sebagai asam laktat.

#### B.7.2 Peralatan

- a) Timbangan;
- b) pipet mikro; dan
- c) alat titrasi.

#### B.7.3 Cara kerja

- a) Timbang contoh sebanyak 20 g contoh (W) ( pipet 20 ml contoh);
- b) larutkan dalam air bebas CO<sub>2</sub> sebanyak 2 kali volume; dan
- c) tambahkan 2 tetes indikator p.p dan titrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terentuk warna merah muda.

#### B.7.4 Perhitungan

1 ml 0,1 N NaOH = 0,0090 g asam laktat

$$\text{Jumlah asam} = \frac{V \times N \times 90}{W} \times 100 \%$$

#### keterangan :

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- V adalah volume larutan NaOH, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- N adalah normalitas larutan NaOH.

### B.8 Cemarkan logam

#### B.8.1 Penetapan timbal (Pb)

##### B.8.1.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

##### B.8.1.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- c) penangas listrik;
- d) kertas Whatman no. 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;



- f) spektrometer serapan asam (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu dan Pb) terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- j) gelas piala 250 ml; dan
- k) penangas air.

### B.8.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat (37 %, Bj 1,19);
- c) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
encerkan 7 ml  $\text{HNO}_3$  65 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
encerkan 500 ml  $\text{HCl}$  37 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 % dalam alkohol;  
Larutkan 10 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Pb;  
pipet 1,000 g Pb dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukan ke dalam labu ukur 1 000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- g) larutan baku 50  $\mu\text{g/ml}$  Pb; dan  
pipet 5,0 ml larutan baku 1 000  $\mu\text{g/ml}$  Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- h) larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml; 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50  $\mu\text{g/ml}$  kemudian tambahkan 5 ml larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 2,0  $\mu\text{g/ml}$  Pb.

### B.8.1.4 Cara kerja

- a) Timbang dengan teliti 5 g sampai dengan 10 g (m) contoh dalam cawan porselin/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji menjadi arang dan tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur ( $500 \pm 5$ ) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml  $\text{HCl}$  6 N atau 5 ml  $\text{HNO}_3$  1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V); (jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring Whatman no.41)



- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 283 nm ;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

#### B.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timbal (Pb) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

##### Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter, ( $\mu\text{g/ml}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### B.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika kisaran dari nilai rata-rata hasil kandungan logam timbal (Pb) lebih besar dari 16 % maka analisis harus diulang.

### B.8.2 Penetapan merkuri (Hg)

#### B.8.2.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

#### B.8.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- d) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- e) labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi;
- f) penangas listrik;
- g) gelas ukur 25 ml; dan
- h) pipet ukur berskala 0,05 atau mikroburet terkalibrasi.

#### B.8.2.3 Pereaksi

- a) Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N;
- b) asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 N;
- c) batu didih;
- d) campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- e) hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- f) larutan molibdat 2 %.
- g) larutan pereduksi;



campurkan 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- h) larutan  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i) larutan pengencer;  
masukkan 300 ml sampai 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml  $\text{HNO}_3$  kemudian 67 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) larutan baku 1 000  $\mu\text{g}$  /ml Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) larutan baku 1  $\mu\text{g}$  /ml Hg; dan  
pipet 1 ml larutan baku 1 000  $\mu\text{g}$  /ml Hg ke dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g}$  /ml.
- l) larutan baku kerja Hg;  
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g}$ /ml; 0,005  $\mu\text{g}$ /ml; 0,01  $\mu\text{g}$ /ml; dan 0,02  $\mu\text{g}$ /ml Hg.

#### B.8.2.4 Cara kerja

##### B.8.2.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N, 20 ml  $\text{HNO}_3$  7 N, 1 ml larutan Natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 ml  $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g}$ /ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.



**B.8.2.4.2 Destruksi menggunakan *digester microwave* dengan sistim tertutup**

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml HNO<sub>3</sub>, 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg /ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

**B.8.2.5 Perhitungan**

$$\text{Kandungan logam merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

**Keterangan:**

- C adalah konsentrasi Hg dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg /ml)  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).  
 Fp adalah faktor pengenceran

**B.8.2.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi maksimal 16 %. Jika kisaran dari nilai rata-rata kandungan logam merkuri (Hg) lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

**B.9 Cemarkan arsen (As)****B.9.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As<sup>5+</sup> direduksi dengan KI menjadi As<sup>3+</sup> dan direaksikan dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> sehingga terbentuk AsH<sub>3</sub> yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

**B.9.2 Peralatan**

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu Kjeldahl 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml;
- gelas ukur 25 ml;



- i) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- j) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikroburet terkalibrasi; dan
- k) labu borosilikat berdasar bulat 50 ml.

### B.9.3 Perekaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- c) natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- d) asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
larutkan 66 ml  $\text{HCl}$  37 % ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml  $\text{HCl}$  37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %;  
timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/ml;  
larutkan 3,75 g  $\text{MgO}$  dengan 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- h) larutan baku 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan baku 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As;  
pipet 10 ml larutan baku arsen 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As.
- j) larutan baku 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As; dan  
pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As.
- k) larutan baku kerja As;  
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dan 0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  As.

### B.9.4 Cara kerja

#### B.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) dalam labu *Kjeldahl* 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 ml sampai 8 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 10 ml  $\text{HClO}_4$  20 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 ml amonium oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;



- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 ml larutan di atas dan tambahkan 2 ml HCl, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh

#### B.9.4.2 Destruksi dengan *microwave* atau dengan sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 5-10 ml larutan destruksi (c) kedalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambah 1 ml larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . Uapkan diatas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur pada suhu  $450^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan dan larutkan dengan 2,0 ml HCL 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,05  $\mu\text{g/ml}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

#### B.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/ml}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);  
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).  
 Fp adalah faktor pengenceran



### B.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi maksimal 16 %. Jika kisaran dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As) lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

## B.10 Cemarkan mikroba

### B.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji bakteri *coliform* dan jumlah kultur starter

#### B.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### B.10.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- gelas piala steril;
- labu Erlenmeyer steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril;
- tabung reaksi;
- pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi; dan
- penangas listrik.

#### B.10.1.3 Larutan Pengencer

*Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB) :*

- |                            |        |
|----------------------------|--------|
| - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 34 g   |
| - air suling               | 500 ml |

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2 tepatkan volume sampai 1000 ml dengan air destilata. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigador untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air destilata sampai volume 1000 ml, kemudian dimasukkan kedalam tabung sebanyak 90 ml, atau  $(99 \pm 1)$  ml dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### B.10.1.4 Homogenisasi contoh

- timbang 50 ml contoh dan masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10;
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

### B.10.2 Cara uji bakteri *coliform*

#### B.10.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).



**B.10.2.2 Peralatan**

- a) Cawan Petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- b) pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- c) botol pengenceran ( $\pm 20$  ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- d) lemari pengering (Inkubator),  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- e) tabung reaksi dan tabung durham;
- f) rak untuk tabung reaksi;
- g) jarum ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm; dan
- h) penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi,  $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ .

**B.10.2.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi**

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *Lauryl tryptose (LST) broth*; dan
- b) *brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2 %.

**B.10.2.4 Cara kerja****B.10.2.4.1 APM – Uji pendugaan untuk bakteri *coliform*****B.10.2.4.1.1 Persiapan contoh uji**

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- $(24 \pm 2)$  jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, karena ini adalah uji pendugaan yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

**B.10.2.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *coliform***

- a) Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel B.1, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ; dan
- e) laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.



**Tabel B.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh**

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

### B.10.3 Cara uji *Salmonella sp*

#### B.10.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella sp* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp*.

#### B.10.3.2 Peralatan

- Neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- kertas pH;
- pipet 10 ml;
- pipet tetes;
- botol pengencer 1000 ml;
- tabung reaksi;
- gelas ukur 10 ml, dan 100 ml;
- cawan Petri 90 mm – 100 mm dan 140 mm – 150 mm;
- gelas sediaan;
- inkubator 35 °C;
- oven;
- penangas air;
- pengaduk gelas;
- sengkelit (ose) / jarum inokulasi;
- pensil lilin
- bunsen; dan
- otoklaf.



**B.10.3.3 Perbenihan dan pereaksi**

- a) *Media Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus terbuat dari individual ingredien, bukan formulasi komersial);
- b) *tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant green*);
- c) *xylose lysine desoxycholate (XLD) broth* ;
- d) *hektoen enteric* (HE) agar;
- e) *bismuth sulfite* (BS) agar;
- f) *triple sugar iron* (TSI) agar ;
- g) *buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) *urea agar*;
- i) *brilliant green dye solution* 1 %;
- j) air destilata steril;
- k) pereaksi indol dan pembenihan indol;
- l) *lysine decarboxylation medium* (LDC);
- m) *nutrient agar*;
- n) *reagen kovacs*;
- o) *polyvalent somatic (o) test*;
- p) *polyvalent flagellar (h) test*;
- q) 1 N HCl;
- r) 1 N NaOH;
- s) larutan *physiological saline* 0,85 %;
- t) larutan *potassium hydroxide* 40 %;
- u) larutan *formalized physiological saline*;
- v) *rapid urea broth*;
- w) *mac conkey agar*;
- x) *simmon citrate agar*;
- y) *triptone broth*;
- z) *lactose broth*;
- aa) *trypticase (tryptic) soy broth*;
- bb) *trypticase soy-trytose broth*;
- cc) *malonate broth*;
- dd) *lysine iron agar*;
- ee) *potassium cyanide* (KCN) broth;
- ff) *phenol red carbohydrate broth*;
- gg) *purple carbohydrate broth*;
- hh) *brain heart infussion* (BHI) broth;
- ii) *tryptose blood agar base*; dan
- jj) *bromocresol purple dye solution*, 0,2 %;

**B.10.3.4 Cara kerja****B.10.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan**

- a) Timbang 25 ml contoh ke dalam botol pengencer 500 ml dan tambahkan 225 ml *Lactose broth* steril, kocok selama 2 menit;
- b) biarkan pada suhu ruang selama  $(60 \pm 5)$  menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai  $(6,8 \pm 0,2)$  dengan menambahkan 1 N NaOH atau 1 N HCl steril;
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *Briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya  $\frac{1}{4}$  putaran, inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C.



**B.10.3.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)**

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 100 ml RV *medium* dan pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 100 ml *tetrathionate broth* (TTB) dan vortex masing-masing campuran tersebut
- inkubasikan RV *medium* pada suhu  $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dan TTB pada  $(35 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam.

**B.10.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif**

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan Petri yang berisi media XLD, HE, dan BS agar. Siapkan BS agar satu hari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ ;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp*;  
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :  
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp* dari masing-masing media agar selektif setelah  $(24 \pm 2)$  jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella sp* adalah sebagai berikut:

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella sp* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media sekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS agar setelah inkubasi  $(24 \pm 2)$  jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama  $(24 \pm 2)$  jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS agar selama inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik , LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu  $5 ^\circ\text{C}$  sampai dengan  $8 ^\circ\text{C}$ ;
- inkubasi TSI dan LIA pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya  $\text{H}_2\text{S}$  yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella sp* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan dengan atau tanpa  $\text{H}_2\text{S}$  (warna kehitaman agar). Pada LIA kultur *Salmonella sp* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan



hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella sp* membentuk H<sub>2</sub>S pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella sp* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;

- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella sp* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella sp* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai no. f) di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap :
- tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, RV ;
  - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

### B.10.3.5 Identifikasi *Salmonella sp*

#### B.10.3.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *Mac Conkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella sp*:
- *Mac Conkey agar*;  
Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
  - *Hektoen Enteric (HE)*; dan  
Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
  - *Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar*.  
Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella sp* pada media TSI dan LIA seperti sub pasal B.10.3.4.3.f dan lanjutkan seperti pada sub pasal B.10.3.4.3.g.

#### B.10.3.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease konvensional;  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp* dengan jarum inokulasi ke dalam *urea agar*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C.
- b) Uji urease cepat;  
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangan air pada suhu (37 ± 0,5) °C. Reaksi *Salmonella sp* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).



**B.10.3.5.3 Pengujian kultur urease negatif**a) *Lysine Decarboxylase Broth (LDB)*

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu, tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;

Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) *Tryptone (tryptophane) broth (TB)*;

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

- *Potasium Cyanida (KCN) broth*

Pindahkan 1 ose (3 mm) dari biakan dari TB 24 jam ke dalam media *KCN broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan. Umumnya *Salmonella sp* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*

Pindahkan 1 ose (3 mm) dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang *Malonate broth* tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna ) pada *broth* ini.

- *Uji indol*

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml pereaksi *kovacs*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella sp* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella sp* bila reaksi indol positif dan flagellar (H) negatif atau KCN positif dan LDB negatif;

**B.10.3.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)**a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan *reaksi urease* negatif ke dalam: - *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai 6 jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau - *Trypticase Soy Trypticase broth (TSTB)* dan inkubasi selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^\circ\text{C}$  (untuk uji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas;b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella sp polyvalent flagellar (H) antisera*. Masukkan  $\pm 0,5$  ml larutan *saline Salmonella sp polyvalent flagellar (H) antisera* dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 antigen yang



akan diuji. Siapkan kontrol saline dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized antigen*. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam;

- positif: terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
- negatif: tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol; dan
- non spesifik: terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol

#### B.10.3.5.5 Uji serologi dengan *polyvalent somatic (o)*

- a) Dengan menggunakan pensil lilin, buat garis empat persegi panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai 48 jam dengan 2 ml 0,85 % saline menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *Tryptose Blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- d) tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic (o)* anti serum kedalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic (o)* menunjukkan hasil sebagai berikut:
  - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan.
  - negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan.
  - non spesifik : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline.

#### B.10.3.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella sp*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel B.2 pasal 1 – 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella sp*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar (H)* tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella sp* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada sub pasal B.10.3.5.1 di atas dan uji kembali pada sub pasal B.10.3.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel B.2 :

- a) *Phenol red lactose atau purple lactose broth*
  - Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam. Inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam.
  - Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.



- Dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp* jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*;
- b) *Phenol red sucrose broth* atau *purple sucrose broth*  
Ikuti prosedur seperti pada 10.3.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl Red - Voges Proskauer (MR – VP)*, dan  
Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .  
Lakukan uji Voges-Proskauer (MR-VP) pada suhu ruang sebagai berikut :
  - Pindahkan 1 ml MR-VP broth yang telah diinkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP broth selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
  - Tambahkan 0,6 ml alpha naftol dan aduk.
  - Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam.
  - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp* memberikan reaksi VP negatif.*Uji merah metil (MR)*
  - Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam.
  - Amati hasilnya dengan segera.
  - Umumnya *Salmonella sp* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukan reaksi negatif;
  - Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Simmons citrate agar*
  - Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring
  - Inkubasikan selama  $(96 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
    - positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dan hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil citrat positif; dan
    - negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

#### B.10.3.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella sp* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.2. Laporkan sebagai bukan *Salmonella sp* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.3. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukan reaksi *Salmonella sp* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari subpasal B.10.3.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.



Tabel B.2 - Reaksi biokimia dan serologi *Salmonella sp*

Uji substrat	Hasil Reaksi Positif	Hasil Reaksi Negatif	Salmonella sp Reaksi Species
Glucose	tusukan kuning	tusukan merah	+
Lysine decarboxylase (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
H <sub>2</sub> S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
Urease	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	-
Lysine decarboxy Broth	Warna ungu	Warna kuning	+
Phenol red dulcitol broth	Warna kuning dan/atau gas	Tidak terbentuk gas; tidak berubah warna	+b
KCN broth	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
Malonate broth	Warna biru	Tidak berubah warna	-c
Indol test	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
Polyvalent flagellar test	Menggumpal	Tidak menggumpal	+
Polyvalent somatic test	Menggumpal	Tidak menggumpal	+
Phenol red lactose broth	Warna kuning dan/atau gas	Tidak terbentuk gas; tidak berubah warna	-c
Phenol red sucrose broth	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
Voges-proskauer test	Merah muda sampai merah	Tidak berubah warna	-
Methyl red test	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
Simmons citrate	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	V
<b>Keterangan :</b> + <sup>a</sup> adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari - adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari V adalah variabel b adalah mayoritas dari kultur <i>S arizonae</i> : negatif c adalah mayoritas dari kultur <i>S arizonae</i> : positif			

Tabel B.3 - Reaksi biokima dan serologi untuk non *Salmonella sp*

Test Substrat	Hasil
Urease	Positif (warna ungu merah)
Test indol dan test polivalen flagellar (H)	Negatif (tidak ada penggumpalan)
Lysine decarboxylase dan KCN broth	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)
Phenol red lactose broth	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) <sup>a b</sup>
Phenol red sucrose broth	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) <sup>b</sup>
Voges- Prokauer test methyl red test	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)
<b>Keterangan :</b> <sup>a</sup> Test malonate broth positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut <i>Salmonella sp arizonae</i> <sup>b</sup> Jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella sp</i> uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella sp</i>	



## B.10.4 Cara uji *Listeria monocytogenes*

### B.10.4.1 Prinsip

Mengisolasi bakteri *Listeria* dengan media diperkaya, kemudian diisolasi atau diseleksi *Listeria monocytogenes* dari spesies *Listeria* yang lain dengan media selektif dilanjutkan dengan uji serologi.

### B.10.4.2 Peralatan

- a) Neraca yang terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- b) tutup gelas preparat;
- c) erlenmeyer 500 ml;
- d) tabung fermentasi Durham;
- e) *marker*;
- f) inkubator, 30 °C dan 35 °C;
- g) minyak imersi;
- h) jarum lup;
- i) jarum inokulasi;
- j) gelas preparat;
- k) jarum, 26 gauge, 3/8 inchi;
- l) mikroskop fase kontras dengan objektif fase minyak imersi (100 x);
- m) cawan Petri;
- n) pipet, 25 ml, 10 ml dan 1 ml;
- o) tabung bertutup ulir, 16 x 125 mm atau ukuran yang sesuai;
- p) blender dan jar atau *Stomacher* dan kantong *Stomacher*; dan
- q) *syringe tuberculin*, steril dan *disposable*.

### B.10.4.3 Perbenihan dan perekasi\*

- a) Asam asetat, 5 N;
- b) *acriflavine monohydrochloride*;
- c) agar (*Difco Laboratories*);
- d) *N*-(1-naphthyl) ethylene diamine;
- e) pereaksi  $\alpha$ -Naphthol;
- f) *blood agar base no. 2 (unipath)*;
- g) *cycloheximide*;
- h) *natamycin (pimaricin)*;
- i) *sheep blood, debrinated*;
- j) etanol, *absolute*;
- k) *fluorescent antibody (FA) buffer* (*Difco*);
- l) *glycine anhydride*;
- m) *gram stain kit*;
- n) larutan hydrogen peroksida, 3 % untuk tes katalase;
- o) larutan KOH 40 %;
- p) *Listeria-typing sera set* (*Difco*);
- q) *lithium chloride-phenylethanol-moxalactam* (LPM) agar dengan ditambah *esculin* dan besi;
- r) *nalidixic acid (sodium salt)*;
- s) *nitrate reduction medium* dan *nitrate detection reagent*;
- t) *nutrient broth*;
- u) *physiological saline solution*, 0,85 %;
- v) *purple carbohydrate fermentation broth base*, mengandung 0,5 % larutan-larutan dekstrosa, *esculin*, maltosa, rhamnosa, mannitol dan xilosa;



- w) SIM *medium* (Becton-Dickinson *Microbiology Systems*) atau *motility test medium* (MTM, Difco);
  - x) pereaksi *sulfanilic acid*;
  - y) *trypticase soy agar* dengan 0,6 % *yeast extract* (TSAye);
  - z) *trypticase soy broth* dengan 0,6 % *yeast extract* (TSBye);
  - aa) media oxford (OXA);
  - bb) *buffered Listeria enrichment broth* (BLEB);
  - cc) agar PALCAM;
  - dd) caragenan (Sigma type II);
  - ee) agar BCM;
  - ff) agar MOX;
  - gg) agar ALOA;
  - hh) agar *Chromogenic Listeria*;
  - ii) Rapid L'mono;
  - jj) CHROMagar *Listeria*; dan
  - kk) *Tryptose broth and agar* (Difco).
- \*) Merk lain dapat digunakan asalkan media/pereaksinya sama.

#### B.10.4.4 Cara kerja

##### B.10.4.4.1 Prosedur pengambilan contoh dan pengayaan

###### B.10.4.4.1.1 Perlakuan contoh

Penyimpanan contoh dilakukan pada suhu 4 °C. Suhu tersebut direkomendasikan untuk penanganan, penyimpanan dan pengiriman bahan yang akan dianalisa. Bila contoh telah membeku, contoh tidak perlu dicairkan dulu, pencairan dilakukan pada waktu akan dianalisa.

###### B.10.4.4.1.2 Persiapan contoh

Timbang 25 ml contoh cair, tambahkan 225 ml BLEB. Selanjutnya dihomogenasi dengan blender atau *stomacher* sampai benar-benar homogen. Selain itu, siapkan 25 g atau 25 ml contoh yang lain untuk penghitungan kemungkinan patogen.

###### B.10.4.4.1.3 Pengkayaan

Setelah diinkubasi selama 4 jam pada suhu 30 °C, tambahkan agensia selektif (*cycloheximide*, jika agensia ini tidak tersedia, gunakan *pimaricin* atau *natamycin* pada 25 mg/L), dan lanjutkan inkubasi sampai 48 jam pada suhu 30 °C. Natamisin lebih aman digunakan daripada *cycloheximide*.

##### B.10.4.4.2 Prosedur Isolasi

Setelah inkubasi 24 jam dan 48 jam, goreskan biakan BLEB ke salah satu media (agar) isolasi /seleksi yang mengandung *esculin* yaitu OXA, PALCAM, MOX dan LPM yang diperkaya dengan *esculin* dan besi (media-media ini diutamakan sesuai dengan urutannya). Selanjutnya media tersebut diinkubasi selama waktu dan suhu tertentu tergantung pada medianya yaitu:

- OXA, PALCAM dan MOX pada suhu 35 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam; dan.
- LPM yang diperkaya pada suhu 30 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam.

Koloni-koloni *Listeria* berwarna hitam dengan disertai *halo* berwarna hitam pada media-media yang mengandung *esculin*. Koloni bakteri tertentu lainnya akan berwarna hitam kecoklatan tetapi warna ini baru akan terjadi bila diinkubasi lebih dari 2 hari. Selanjutnya, pindahkan 5 atau lebih koloni yang berwarna hitam dengan halo tersebut dari media OXA dan PALCAM atau LPM yang diubah atau MOX ke media *Trypticase soy agar* dengan



ekstrak yeast (TSAye), penggoresan ini ditujukan agar didapat koloni isolat yang khas dan murni.

Selain itu, sangat direkomendasikan untuk menggoreskan biakan pada salah satu media seleksi yaitu BCM, ALOA, *RapidL'mono* dan CHROM agar *Listeria* untuk membedakan *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii*, dan diinkubasikan selama 48 jam (selain itu, diinkubasikan juga selama 24 jam) yang berguna untuk memilih media seleksi yang mengandung *esculin*. Rekomendasi ini dimaksudkan agar tidak terjadi kesalahan pengamatan *L. monocytogenes* oleh *L. innocua*. Koloni *L. monocytogenes* akan berwarna biru pada media BCM, sedangkan *L. ivanovii* seringkali tidak ada pada makanan. Sedangkan pada media ALOA, koloni *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii* akan berwarna biru dan di sekelilingnya terdapat area lipolisis.

Pemurnian menggunakan media TSAye merupakan tahap yang harus dilakukan pada analisis konvensional karena koloni yang diisolasi (isolat) pada media agar selektif mungkin masih tercampur dengan suatu kompetitor walaupun kompetitor ini terlihat kurang jelas. Sedikitnya diperlukan 5 isolat, karena lebih dari satu spesies *Listeria* mungkin dapat diisolasi dari contoh yang sama. Penggunaan media BCM dan ALOA akan membantu mengurangi jumlah koloni yang perlu diambil. *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii* dapat dikenali menggunakan media konfirmasi komersial (Biosynth International, Inc.) atau dengan *rhamnose/xylose fermentation broth/agars* yang konvensional.

Inkubasi cawan TSAye pada suhu 30 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam. Media ini juga dapat diinkubasi pada suhu 35 °C apabila koloni tidak akan digunakan untuk uji pergerakan secara basah (Lihat 10.4.4.3.2). Untuk metoda uji cepat yang telah diizinkan (Tabel B.4) penggunaan media/agar isolasi yang selektif yang telah direkomendasikan oleh industri pembuatnya dapat dilakukan tetapi, sebagai catatan diatas, penggunaan tambahan media/agar pembeda *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii* yang baru juga direkomendasikan.

**Tabel B.4 - Kit uji pendeteksi *Listeria* yang diizinkan**

1. AOAC Official Method 993.09. 2000. *Listeria in dairy products, seafoods, and meats. Colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization method* (GENE-TRAK *Listeria* Assay).
2. AOAC Official Method 994.03. 2000. *Listeria monocytogenes in dairy products, seafoods, and meats. Colorimetric monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay method* (*Listeria* Tek).
3. AOAC Official Method 995.22.2000. *Listeria in foods. Colorimetric polyclonal enzyme immunoassay screening method* (TECRA *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA]).
4. AOAC Official Method 996.14.2000. *Assurance (Polyclonal Enzyme Immunoassay Method)*.
5. AOAC Official Method 997.03.2000. *Visual Immoprecipitate Assay*.  
AOAC Official Method 999.06.2000. *Enzyme Linked Immunofluorescent Assay* (ELFA) VIDAS LIS Assay Screening Method.

#### B.10.4.4.3 Prosedur identifikasi

- a) Amati koloni-koloni yang diduga pada media cawan TSAye. Pengamatan dengan menggunakan *Henry oblique transmitted illumination* sangat membantu pada tahap ini tetapi ini bukan merupakan tahap yang harus dilakukan;
- b) Ambil koloni tersangka dari cawan biakan dan buat preparat basah dengan menggunakan saline 0,85 %, selanjutnya ditutup dengan gelas preparat. Tetesi minyak imersi dan periksa di bawah mikroskop fase kontras. Koloni yang dipilih berasal dari



- pertumbuhan yang padat. Jika koloni diambil dari pertumbuhan yang jarang, sel bakteri akan menempel pada gelas preparat dan tidak tampak bergerak. Spesies *Listeria* berbentuk tipis, tangkai pendek dengan sedikit berputar atau bergerak mendatar. Selalu bandingkanlah dengan biakan yang telah diketahui. Bakteri yang berbentuk kokus, batang yang besar atau batang dengan pergerakan cepat seperti berenang bukan sejenis *Listeria*. Sebagai alternatif, gunakan media uji 7 hari bergerak (lihat B.10.4.4.3.i);
- c) Lakukan uji katalase pada koloni yang diduga. Spesies *Listeria* termasuk katalase positif;
  - d) Buat pewarnaan Gram untuk biakan yang berumur 16 jam sampai dengan 24 jam. Semua spesies *Listeria* berbentuk kecil, batang Gram positif, tetapi reaksi pewarnaan dapat berubah-ubah pada biakan yang lebih tua dan selnya nampak menyerupai batang (*coccoidal*). Sel-sel *Listeria* cenderung membentuk pagar pada pewarnaan yang tebal. Ini dapat menyebabkan penolakan palsu yaitu dianggap sebagai suatu *diphtheroid*;
  - e) Ambil koloni yang diduga dan tanam kedalam tabung TSBye untuk uji fermentasi karbohidrat dan media uji lain. Inkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam, biakan ini memungkinkan untuk disimpan pada suhu 4 °C untuk beberapa hari dan digunakan berulang kali sebagai inokulum. Kit komersial tersedia untuk identifikasi isolasi (Lihat 10.4.4.3.k);
  - f) inokulasikan koloni dari TSAye yang banyak ke media agar 5 % *sheep blood* dengan menusuk lempengan yang telah dituang tebal dan kering sempurna (periksa adanya air sebelum digunakan). Buat gambar lajur sebanyak 20 sampai dengan 25 di bagian luar dari alas Petri. Tusukan setiap biakan pada lajur. Selalu tusukan biakan kontrol positif (*L. ivanovii* dan *L. monocytogenes*) dan kontrol negatif (*L. innocua*). Inkubasikan selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 35 °C. Sebisa mungkin tusukan mendekati dasar lapisan agar tanpa menyentuh dasar agar dan memecahkan agar;
  - g) amati lempengan *blood agar* yang telah ditusuk dengan biakan menggunakan cahaya terang. *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* menghasilkan daerah yang agak terang disekeliling tusukan. *L. innocua* menunjukkan tidak ada daerah yang terhemolisis, sedangkan *L. ivanovii* memperlihatkan area terang yang jelas di sekitar tusukan. Jangan mencoba membedakan spesies-spesies pada tahap ini tetapi catat reaksi hemolitik yang terjadi. Reaksi-reaksi yang meragukan ini dapat dijawab dengan uji CAMP. (Catatan: Hemolisis lebih mudah dianalisis jika kedalaman dari agar *blood* lebih tipis dari biasanya yaitu 5 mm. Boleh juga ini dicapai dengan penggunaan suatu teknik hamparan *blood agar* setebal 1-2 mm);
  - h) uji reduksi nitrat. Uji ini bersifat optional. Hanya *L. grayi ssp murrayi* yang akan mereduksi nitrat. Uji ini membedakan *L. grayi ssp murrayi* dengan *L. grayi ssp grayi*. Gunakan biakan TSBye dan diinokulasikan ke dalam *nitrate broth*. Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 5 hari. Tambahkan 0,2 ml pereaksi A, diikuti dengan 0,2 ml pereaksi B. Warna merah-ungu menunjukkan terdapatnya nitrit, yaitu nitrat yang telah direduksi. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan bubuk *zinc* dan diamkan satu (1) jam. Warna merah-ungu yang muncul menunjukkan bahwa nitrat masih ada dan tidak tereduksi.  
Sebagai suatu prosedur alternatif, tambahkan 0,2 pereaksi A, diikuti dengan 0,2 ml pereaksi C. Terbentuknya warna oranye menunjukkan nitrat tereduksi. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan bubuk *zinc* seperti diatas. Munculnya warna oranye menunjukkan nitrat tidak tereduksi;
  - i) inokulasi media SIM atau MTM dengan biakan dari TSBye, inkubasikan selama 7 hari pada suhu ruangan. Amatilah tiap hari, spesies *Listeria* senantiasa bergerak dan membuat pola yang khas seperti payung terkembang sedangkan MTM akan memberikan pola payung yang paling jelas. Sebagai alternatif, amati kultur TSBye yang disimpan pada suhu 30 °C dengan mikroskop fase kontras (1000 x), untuk pergerakan mendatar;
  - j) inokulasikan biakan dari kultur TSBye, ke dalam media karbohidrat 0,5 % dalam *purple carbohydrate broth* (kalau bisa gunakan tabung Durham): dekstrosa, *esculin*, maltosa, rhamnosa, manitol dan xylosa. Inkubasikan selama 7 hari pada suhu 35 °C. Spesies *Listeria* akan memberikan reaksi positif bila menghasilkan asam tanpa terbentuknya gas. Cocokan dengan Tabel B.5. untuk reaksi-reaksi spesies *Listeria* terhadap xylosa,



rhamnosa. Semua spesies akan menghasilkan positif dekstrosa, esculin dan maltosa. Semua spesies *Listeria* kecuali *L. grayi* akan menghasilkan reaksi negatif pada manitol. Jika terjadi pewarnaan isolat pada media OXA, PALCAM, MOX, atau LPM yang ditambah esculin/ $\text{Fe}^{3+}$  adalah tidak meragukan lagi, uji esculin bisa ditiadakan.

**Tabel B.5 - Perbedaan beberapa spesies *Listeria***

Species	Asam yang diproduksi dari				
	$\beta$ -hemolisis <sup>a</sup>	mannitol	rhamnosa	xylosa	virulence <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i> <sup>c</sup>	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V <sup>d</sup>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V <sup>d</sup>	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i> <sup>e</sup>	-	+	V <sup>d</sup>	-	-

**Keterangan:**  
<sup>a</sup> sheep blood agar stab.  
<sup>b</sup> uji Mouse.  
<sup>c</sup> strain yang dapat memfermentasi ribosa diklasifikasikan sebagai *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* dan yang tidak memfermentasi ribosa sebagai *L. ivanovii* subsp. *londiniensis*.  
<sup>d</sup> V, variable biotypes.  
<sup>e</sup> termasuk 2 (dua) subspecies – *L. grayi* subsp. *murrayi* yang mereduksi nitrat dan *L. grayi* subsp. *grayi* tidak mereduksi nitrat.

- k) isolat yang dimurnikan mungkin dapat diidentifikasi secara cepat dengan menggunakan kit komersial (uji tambahan mungkin diperlukan untuk uji spesies secara lengkap): *Vitek Automicrobic Gram Positive* dan *Gram Negative Identification cards* (bioMerieux, Hazelwood, MO) atau *API Listeria* (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) yang tidak memerlukan uji CAMP tambahan. *MIKRO-ID™* kit (bioMerieux, Hazelwood, MO; 1,24) membolehkan penentuan spesies isolate-isolat *Listeria* apabila reaksi CAMP telah dilakukan dan mengenalinya. Baru-baru ini telah diperkenalkan suatu kit untuk penentuan *Listeria* yaitu *Phenotype MicroArray* (BIOLOG, Hayward, CA);
- l) metode uji cepat alternative yang dapat mengidentifikasi isolat *Listeria* sebagai *L. monocytogenes* tercantum pada Tabel B.6. Isolat-isolat mungkin diidentifikasi dalam biakan murni atau dari media OXA atau media agar isolasi selektif yang lain, tergantung pada kitnya. Isolat yang telah dimurnikan, dan diidentifikasi sebagai *Listeria monocytogenes* dengan uji-uji ini harus disimpan sebagai acuan (kepentingan) regulasi.

**Tabel B.6 - Kit uji yang berguna dalam penegasan isolat *Listeria* sebagai *Listeria monocytogenes* atau bukan\***

1. *AccuProbe™ Listeria monocytogenes culture confirmation test* (Gen-Probe, Inc, San Diego, CA).
2. *GeneTrak Listeria monocytogenes test kit* (Neogen, Lansing).
3. *Probelia Listeria monocytogenes test kit* (BioControl, Seattle, WA).
4. *VIDAS Listeria monocytogenes test kit* (bioMerieux).
5. *Transia Plate Listeria monocytogenes* (Diffchamb SA, Lyon, France).
6. FDA, SRL application of Niederhauser et al. method for PCR detection and identification of *L. monocytogenes*.
7. *BAX Listeria monocytogenes test* (Qualicon, Inc, Wilmington, DE).

\* Kit-kit ini mempunyai berbagai tingkat keabsahan (kevalidan) dan apabila validasi nya cocok dapat juga digunakan untuk menyaring pengkayaan *L. monocytogenes*. Sekarang ini, FDA hanya menguraikan kit yang telah divalidasi untuk semua spesies *Listeria*.



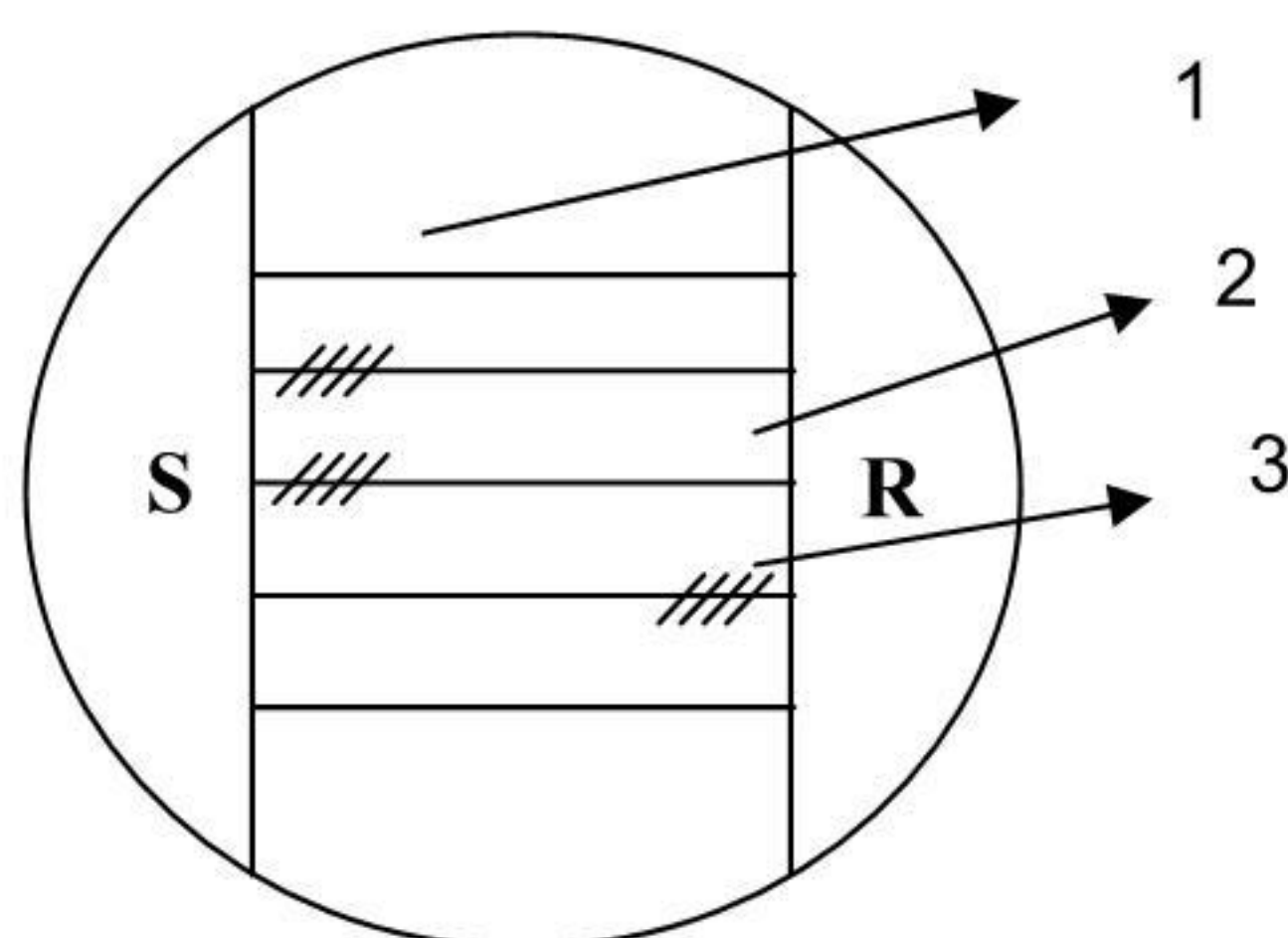
#### B.10.4.4.4 Uji CAMP

**B.10.4.4.4.1** Uji Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) Tabel B.7 dan Gambar B.1 berguna untuk konfirmasi spesies terutama jika uji *blood agar stab* menunjukkan hasil yang samar-samar.

Uji ini dilakukan dengan goreskan biakan  $\beta$  hemolitik *Staphylococcus aureus* dan *Rhodococcus equi* secara parallel /sejajar dan diametris berlawanan satu dengan yang lain pada media agar *sheep blood*. Goreskan beberapa biakan yang diuji sejajar terhadap yang lain tetapi membuat sudut kearah kanan dan diantara goresan *S. aureus* dan *R. equi*. Setelah inkubasi pada 35 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam, amati cawan-cawan tersebut adanya hemolisis. Reaksi hemolisis *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* diperjelas (diperkuat) dalam daerah yang dipengaruhi oleh goresan *S. aureus*. Spesies yang lain tetap tidak menunjukkan reaksi hemolisis. Reaksi *L. monocytogenes* sering kali optimal pada 24 jam daripada 48 jam. Untuk mendapatkan *R. equi* yang cukup agar terjadi goresan (pertumbuhan) yang baik, inkubasikan biakan agar miring selama 48 jam daripada 24 jam. Direkomendasikan untuk menggunakan isolat kontrol (pembanding) *Listeria spp* yang dikenal pada cawan media/agar *sheep blood* yang terpisah. Media/agar *sheep blood* yang digunakan harus baru/sesegar mungkin.

**Tabel B.7 - Uji penguatan hemolisis CAMP dari spesies-spesies *Listeria***

Species	Pengkayaan hemolysis	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> ®
<i>L. monocytogenes</i>	+	-*
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-
* Strain-strain yang jarang adalah S+ dan R+. Reaksi R+ kurang dikenal dibandingkan <i>L. ivanovii</i> . Strain-strain untuk uji CAMP tersedia dari koleksi-koleksi biakan, termasuk American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA.		



**Gambar B.1 - Uji CAMP untuk *Listeria monocytogenes*: pola inokulasi *sheep blood agar plate***

**Keterangan:**

1. Garis horizontal menggambarkan goresan inokulasi dari 5 test strains.
2. Garis vertikal menggambarkan goresan inokulasi *Staphylococcus aureus* (S) and *Rhodococcus equi* (R).
3. Garis-garis *hatched* menunjukkan (hanya merupakan gambaran) lokasi daerah penguatan hemolisis.



**B.10.4.4.4.2** Goreskan *strain* FDA  $\beta$  hemolytic *Staphylococcus aureus* ATCC 49444 (CIP 5710 ; NCTC 7428) atau *strain* ATCC 25923 dan *Rhodococcus equi* (ATCC 6939; NCTC 1621) secara vertikal pada agar *sheep blood* dengan pelan. Pisahkan goresan secara vertikal, oleh karena itu *strain-strain* yang diuji mungkin digoreskan secara horizontal diantaranya tanpa saling bersentuhan. Sesudah diinkubasi 24 jam dan 48 jam pada suhu 35 °C, amati adanya hemolisis didaerah yang dipengaruhi oleh goresan-goresan vertikal (Lihat Gambar B.1 yang menunjukkan susunan goresan-goresan kultur pada media CAMP). Hemolisis dari *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* diperkuat (makin jelas) didekat goresan *S. aureus*; hemolisis *L. ivanovii* diperkuat (makin jelas) didekat goresan *R. Equi*. Spesies yang lain adalah non-hemolisis tidak bereaksi pada uji ini. Uji CAMP membedakan *L. ivanovii* dari *L. seeligeri* dan dapat membedakan suatu *L. seeligeri* yang mempunyai kemampuan hemolisis lemah (yang mungkin dilihat sebagai non-hemolisis) dari *L. welshimeri*. Isolat-isolat yang memberikan reaksi khusus *L. monocytogenes* (kecuali hemolisis) harus diuji CAMP sebelum diidentifikasi sebagai *L. innocua*. Suatu faktor yang dengan mudah disiapkan dari biakan *S. aureus* dapat digunakan untuk memperkuat hemolisis oleh *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* pada cawan media/agar *sheep blood*. Suatu disk (piringan) yang telah diisi dengan  $\beta$  lisin dari *S. aureus* (REMEL, Lenexa, KS) dapat digunakan untuk tujuan yang sama.

#### B.10.4.4.5 Serologi

Uji ini digunakan bila pertimbangan epidemiologi yang sangat mendesak. Gunakan media TSBye untuk diinokulasikan pada media *tryptose broth*, inkubasikan selama 24 jam pada suhu 30 °C. Selanjutnya goreskan kedua tabung *tryptose* agar miring dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C. Cuci kedua agar miring sebanyak 3 ml *Difco Fa buffer* dan pindahkan ke tabung tertutup 16 mm x 125 mm steril. Panaskan dalam *waterbath* 80 °C selama 1 jam. Sentrifus pada 1 600 x g selama 30 menit. Pindahkan 2,2 – 2,3 ml cairan lapisan atas dan encerkan kembali padatan dalam *buffer*. Ikutilah rekomendasi-rekomendasi yang dikeluarkan industri pembuatnya untuk prosedur pengenceran serum dan penggumpalan. Jika perlakuan *serotype flagelar* (H) dan *sub factor* (O) diperlukan, prosedur-prosedurnya dapat diperoleh dari *Food Microbiology Methods Development Branch* (HFF-234) *Division of Microbiology, FDA 200 C street 5 W, Washington DC 20204*.

**Tabel B.8 - Serologi untuk spesies *Listeria***

Spesies	Tipe Serotipe
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, Un <sup>a</sup>
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, Un <sup>a</sup>
Keterangan Un <sup>a</sup> adalah tidak mutlak	

#### B.10.4.4.6 Pernyataan hasil

Semua *Listeria spp* adalah berbentuk batang kecil, katalase-positif, gram-positif yang menunjukkan gerakan pada preparat basah dan pada media SIM. *Listeria* menggunakan dekstrose, *esculin* dan maltosa dan beberapa spesies menggunakan mannitol, rhamnosa dan xylosa dengan menghasilkan asam. Suatu spesies yang menggunakan mannitol dengan menghasilkan asam adalah *L. grayi*. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, dan *L. seeligeri* menghasilkan hemolisis pada tusukan *sheep blood* dan oleh karena itu uji CAMP menunjukkan hasil positif. Dari ketiganya, hanya *L. monocytogenes* yang gagal menggunakan xylosa dan positif untuk menggunakan rhamnosa. Kesukaran dalam membedakan *L. ivanovii* dari *L. seeligeri* dapat diatasi dengan melakukan uji CAMP. *L.*



*seeligeri* menunjukkan peningkatan hemolisis pada goresan *S. aureus* sedangkan *L. ivanovii* menunjukkan peningkatan pada goresan *R. Equi*. Dari spesies-spesies non-hemolisis, *L. innocua* bisa memberikan reaksi yang sama terhadap rhamnosa-xylosa seperti *L. monocytogenes* tetapi akan negatif pada uji CAMP. *L. innocua* kadang-kadang akan menghasilkan tes yang negatif pada penggunaan rhamnosa. *L. welshimeri* yang menghasilkan rhamnosa negatif mungkin atau kadang-kadang keliru dengan hemolisis yang lemah *L. seeligeri* jika tidak dilakukan dengan uji CAMP.

Setelah semua hasil-hasil yang lain tersedia, serotip isolasi *Listeria* menjadi sangat berarti. Secara biokimia, serologi dan pathogen dijabarkan pada Tabel B.5, B.7 dan B.8. Semua data yang diperoleh atau dikumpulkan harus lengkap sebelum penentuan spesies.

## B.11 Kultur Starter

### B.11.1 Prinsip

Pertumbuhan kultur starter setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 24 jam sampai 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

### B.11.2 Peralatan

- Cawan Petri gelas / plastik diameter 15 mm x 90 mm steril;
- pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml;
- penangas air;  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$
- lemari pengering (inkubator);
- alat penghitung koloni (*colony counter*);
- autoclave*; dan
- oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi

### B.11.3 Pembenihan dan pengencer

*De Man Rogosa and Sharpe* (MRS);

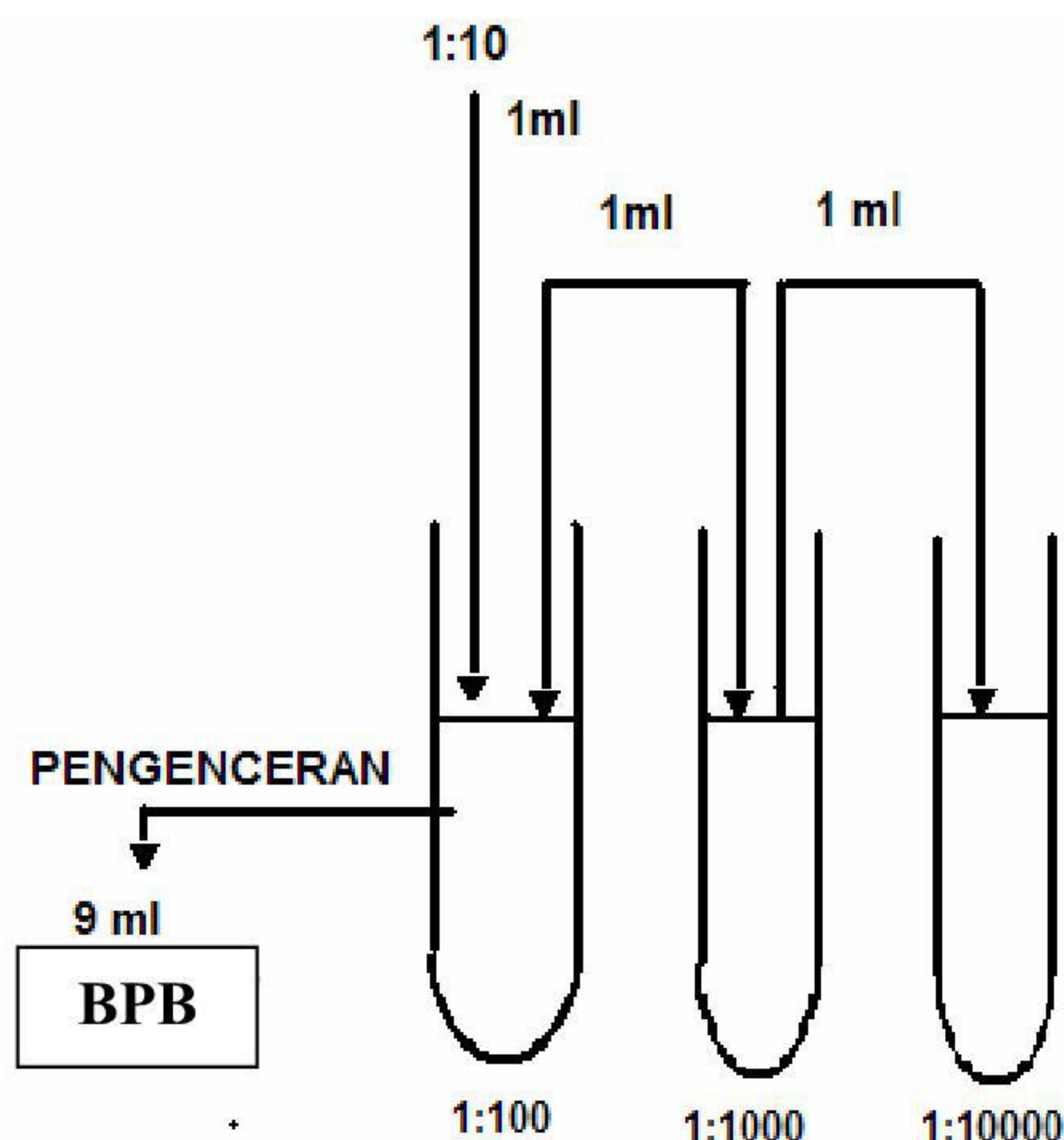
- Pepton from casein	10 g
- Yeast extract	4 g
- D(+)-Glukose	20 g
- Agar	14 g
- Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan sebanyak 300 sampai dengan 350 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

### B.11.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1
- buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar B.2 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);





Gambar B.2 - Metoda pengenceran

- pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-5}$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 ml sampai 15 ml media MRS yang masih cair dengan suhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  ke dalam masing-masing cawan petri.;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 24 jam sampai 48 jam;
- catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai 250 koloni setelah 48 jam;

### B.11.5 Perhitungan

Jumlah kultur starter (koloni/ml) =  $n \times F$

#### Keterangan:

$n$  adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dengan koloni/ml

$F$  adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

### B.11.6 Pernyataan hasil

#### B.11.6.1 Cara menghitung

- pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni - 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;



- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$cfu = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$cfu = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

keterangan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

$n_1$  adalah jumlah Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

$n_2$  adalah jumlah Petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$cfu = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;

- Jika jumlah koloni per  $cm^2$  kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- Jika jumlah koloni per  $cm^2$  lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $cm^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $cm^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah;

- f) menghitung koloni perambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- Merupakan rantai yang tidak terpisah;
- Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan;
- Perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.



**B.11.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka**

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5 maka bulatkan kebawah;  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
  - Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$





## Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 947.05, Acidity of Milk* 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.06.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 945.46, Ash of Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.10.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 989.05, Fat in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.26.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 991.20, Nitrogen (Total) in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.11.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 968.12, Sampling of Dairy Products*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 990.19, Solid (total) in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.43.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 990.20, Solid (total) in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.44.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 990.20, Solids-Not-Fat in Milk*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 33.2.45.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods*, 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. 2005. kategori pangan 01.0. Produk-produk susu dan Analognya, kecuali yang termasuk Kategori 02.0
- Codex Alimentarius Commission. 1996. *FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Food (AQL-6,5) CAC/RM 42/1966*.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2002. *Enumeration of Echerichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2006. *Salmonella sp.* Chapter 5.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2003. *Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods*. Chapter 10.
- Merck Microbiology Manual. DEMAN, ROGOSA, and SHARPE, 12<sup>th</sup> Edition.









**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)